

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

Ehem. Direktor: Professor Dr. med. P. Pulewka

Versuche über Beziehungen
zwischen chemischer Struktur
und pharmakologischer Wirkung
des Andromedotoxins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingeborg Hartenstein
aus Berlin

1967

9086

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

Ehem. Direktor: Professor Dr. med. P. Pulewka

Versuche über Beziehungen
zwischen chemischer Struktur
und pharmakologischer Wirkung
des Andromedotoxins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingeborg Hartenstein
aus Berlin

1967

Dekan: Professor Dr. F. Lembeck

Berichterstatter: Professor Dr. P. Pulewka

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
A. Stand der Arbeitsmethodik	1
Chemie des Andromedotoxins	1
Pharmakologische Wirkungen	4
B. Problemstellung und Thema der Arbeit	5
II. EXPERIMENTELLER TEIL	7
A. Chemische Versuche	7
1. Isolierung des Andromedotoxins aus dem Rohextrakt	7
2. Hydrolyse des Andromedotoxins zu Andromedol	10
3. Dünnschicht-Chromatographie von Andromedotoxin und Andromedol	12
4. Acetylierung von Andromedol	13
5. Acetylierung von Andromedotoxin	18
6. Hydrolyse der Diacetylverbindung	20
7. Versuche über die Dehydratisierung des Andromedols zu Monoanhydroandro- medol und Dianhydroandromedol	20
B. Pharmakologische Versuche	28
1. Versuche mit Andromedotoxin	29
2. Versuche mit Andromedol	36
3. Bestimmung der Wirkung des Mono- acetylderivates von Andromedol	41
4. Bestimmung der Wirkung von Diace- tylandromedol	41

5. Bestimmung der Wirkung des Mono- anhydro- und Dianhydroderivates von Andromedol	41
III. DISKUSSION	42
IV. ZUSAMMENFASSUNG	46
V. LITERATURVERZEICHNIS	48
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

A. STAND DER ARBEITSMETHODIK

Chemie des Andromedotoxins:

Andromedotoxin ist das erste Mal von Eykmann 1882 unter dem Namen Asebotoxin als ein Giftstoff aus *Andromeda japonica* beschrieben worden.

Plugge hatte ein Jahr später einen ähnlichen Stoff aus Blättern verschiedener *Andromeda*-Arten isolieren können. De Zaayer gelang es 1886 - 1887 eine pharmakologisch wirksame kristalline Substanz aus Blättern von *Rhododendron ponticum* zu gewinnen, die er Andromedotoxin nannte. Schmelzpunkt dieser Substanz: 228 - 229°C.

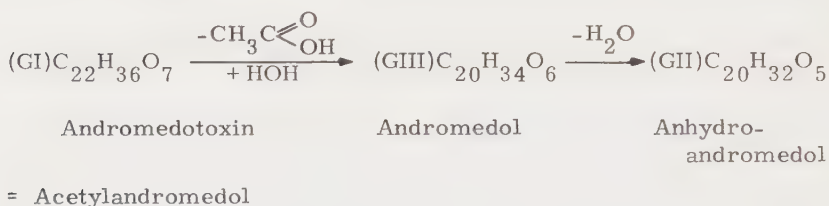
Summenformel: $C_{31}H_{51}O_{16}$.

Archangelski bestätigte 1901 das Vorkommen einer derartigen Substanz in verschiedenen *Rhododendron*-Arten. 1921 veröffentlichte Hardikar erstmalig einen Bericht über die Analyse und Synthese eines kristallinen Stoffes aus *Rhododendron*blättern nicht näher definierter Arten. Der Stoff hatte einen Schmelzpunkt von 258°C und eine Summenformel von $C_{19}H_{30-32}O_6$ und wurde als reines Andromedotoxin angesehen.

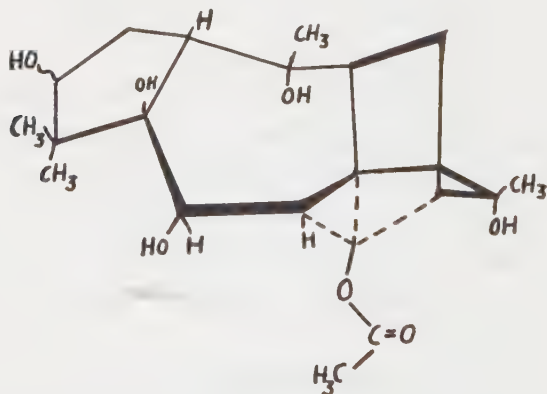
Makino erhielt 1940 aus *Rhododendron hymenanthos* ein kristallines stickstoffreies Produkt mit einem Schmelzpunkt von 245°C, dem er den Namen Rhodotoxin gab (1). Die Aufklärung der Struktur des Andromedotoxins gelang 1961 Iwasa bzw. Kakisawa und Mitarbeitern. Sie fanden in der *Ericaceae* *Leucothoe grayana* drei kristalline Komponenten, die sie mit Grayanatoxin I, identisch mit Andromedo-

toxin (Schmpkt: 271°C), Grayanatoxin II, identisch mit Anhydro-andromedol (Schmpkt: 198°C) und Grayanatoxin III, identisch mit Andromedol (Schmpkt: 215°C), bezeichneten (2, 3).

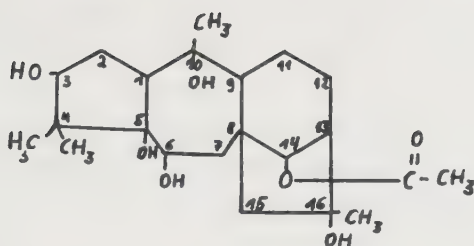
Diese drei Komponenten zeigten folgende gegenseitige Beziehungen:



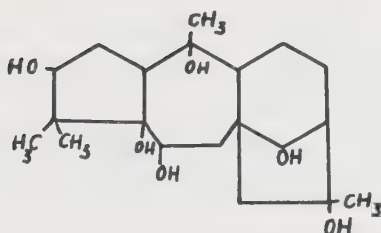
Die Stereochemie des von Iwasa und Mitarbeitern als eine Art von Diterpen bezeichneten neuartigen Kohlenstoffgerüsts konnte 1962 von W. H. Tallent aufgezeigt werden (2, 4).



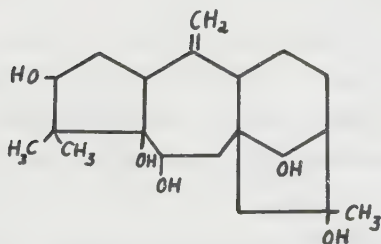
Andromedotoxin, wie es in Rhododendron- und Andromeda-Arten vorkommt, ist eine stickstofffreie Verbindung. In reinem Zustand besteht es aus farblosen Nadeln. Es ist löslich in polaren, unlöslich in unpolaren Lösungsmitteln. Sein Schmelzpunkt liegt nach Wood (1) bei 260 - 270°C.



Andromedotoxin = Grayanatoxin I



Andromedol = Grayanatoxin III



Anhydroandromedol = Grayanatoxin II

Pharmakologische Wirkungen

Andromedotoxin befindet sich im Gift- und Tollhonig, den die Türken "deli bal" nennen; es ist für die Giftigkeit dieses Honigs verantwortlich (5). Der Honig wird von den Bienen aus den Blüten der über weite Gebiete Kleinasiens verbreiteten Rhododendronarten gesammelt, vorwiegend aus *Rhododendron ponticum* und *Rhododendron flavum*. Auch heute noch kommen in der Türkei Vergiftungen durch andromedotoxinhaltigen Honig vor (6).

Andromedotoxin hat sich im Tierversuch als starkes Nerven- und Respirationsgift gezeigt. Es kommt, vorwiegend infolge Phreniculuslähmung, Wirkung auf die Vagusendigungen und Lähmung des Atemzentrums, zu schweren Atemstörungen und Dyspnoe (5, 7).

In hohen Dosen erzeugt es Krämpfe, verbunden mit Schnappatmung. Überlebt das Tier diesen Zustand, stellt sich eine tiefe, länger andauernde paralytische Schwäche ein (7, 8).

Kleine Andromedotoxingaben senken den Blutdruck, wahrscheinlich aufgrund einer echten peripheren Vasodilatation, die sowohl durch Sensibilisierung der Carotis-Rezeptoren als auch durch eine zentralnervöse Komponente zustande kommt (Hildebrandt und Mitarbeiter (5)).

Größere Dosen haben eine blutdruckerhöhende Wirkung, die vorwiegend auf einer Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark beruht (Moran und Mitarbeiter (8)).

Bei intravenöser Zufuhr kann am Blutdruck der Katze Tachyphylaxie beobachtet werden. Am Herzen hat Andromedotoxin eine digitalisähnliche Wirkung mit Sinusbradykardie und Überleitungsstörungen bei hoher Dosierung (5).

Bei weißen Mäusen läßt sich mit Andromedotoxin das Respirationszeichen auslösen, eine infolge eines wiederholt auftretenden Bronchialverschlusses durch Nervenreizgifte hervorgerufene Erscheinung. Sie wurde im Jahre 1893 erstmals von Duquesnel und Laborde

bei tödlich mit Aconitin vergifteten Meerschweinchen als "une sorte de hoquet" beschrieben, im Jahre 1934 von Pulewka und Grevenor weiter untersucht, sowie von Pulewka, Bühler und Klumpp aufgeklärt (9, 10, 11).

Eine Senkung der Körpertemperatur konnte in Versuchen von Pulewka und Vahrson (12) schon nach kleinen Dosen nachgewiesen werden, bei hoher Dosierung war sie sehr ausgesprochen.

Beim Menschen ruft Andromedotoxin, in Spuren auf die Schleimhäute gebracht, starke Reizerscheinungen hervor. Auf der Nasenschleimhaut erzeugt es heftigen Niesreiz, auf der Augenbindehaut bei empfindlichen Personen konjunktivale Reizerscheinungen mit Brennen, Jucken, Tränenlaufen und Lichtscheu (eigene Beobachtung).

Vergiftungserscheinungen beim Menschen äußern sich in Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Schwindel, Kopfschmerzen, malariaartigen Fieberanfällen, starkem Schwitzen, Magen- und Leibschmerzen, Ohnmacht bis zur völligen Bewußtlosigkeit (6).

B. PROBLEMSTELLUNG UND THEMA DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurde mir die Aufgabe gestellt, das Molekül des Andromedotoxins in seiner chemischen Struktur zu verändern und die erhaltenen Derivate auf ihre pharmakologische Wirksamkeit an der weißen Maus auszutesten.

Es sollte untersucht werden, welche Stellen des Moleküls chemisch abgewandelt werden können, ohne daß eine Minderung der pharmakologischen Wirksamkeit eintritt, und umgekehrt, durch welche chemische Veränderung des Moleküls die Wirkung verloren geht.

Der chemische Teil der Arbeit befaßt sich mit der Hydrolyse des Andromedotoxins zu Andromedol, der Acetylierung des Andromedols

und Andromedotoxins zu Monoacetylandromedol und Diacetylandromedol und dem Versuch der Dehydratisierung zu Anhydroandromedol. Als Test zur Bestimmung der Wirksamkeit diente die Beobachtung des Respirationszeichens (RZ) und der Körpertemperatur bei weißen Mäusen. Ferner wurden das Auftreten von Salivation und Krämpfen am Versuchstier registriert.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A. CHEMISCHE VERSUCHE

1. Isolierung des Andromedotoxins aus dem Rohextrakt

(Vorschrift der Firma Dr. Willmar Schwabe vom 23.2.1962)

Der Rohextrakt wurde uns von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt, der wir auch an dieser Stelle dafür danken.

Aus dem ersten Rhododendron-Rohextrakt, der 1,03 % Andromedotoxin enthielt, war von der Firma Schwabe ein Konzentrat hergestellt und auf Milchzucker aufgetrocknet worden, so daß der Gehalt 6,6 % Andromedotoxin betrug.

50 gr. Andromedotoxin-Konzentrat wurden im Soxhlett-Apparat mit 550 gr. Chloroform auf dem warmen Wasserbad 3 Stunden lang extrahiert. Das Chloroform wurde im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 24 ml. Aceton eingerührt. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen, währenddessen sich die Hauptmenge an Andromedotoxin in Form einer dunkelgrünen harzigen Masse absetzte, in der einzelne kristalline Nadeln erkennbar waren. Der Rest der Lösung wurde abgesaugt und das Filtrat mit der gleichen Menge Wasser versetzt. Es wurden 5 ml. Benzol zugegeben und im Schütteltrichter kräftig geschüttelt. Nach mehreren Stunden trennten sich in der Regel die Schichten; war dies nicht der Fall, wurde Chloro-

form zugesetzt. Die oberste Schicht wurde eingeeengt und in möglichst wenig Aceton aufgenommen, aus dem in 1 - 2 Tagen die Restmenge Andromedotoxin auskristallisierte. Aus der erhaltenen dunkelgrünen, stark verharzten Masse ließ sich das reine Andromedotoxin nur schwer gewinnen.

Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren in Aceton, bzw. Ausfällen mit Petroläther aus acetonischer Lösung. Eine kleine Menge des Rohproduktes wurde in siedendem Aceton gelöst, die noch heiße Lösung durch ein gewöhnliches Filter gegeben und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und bei Zimmertemperatur getrocknet. Die restlichen, noch im Lösungsmittel vorhandenen Anteile wurden mit Petroläther ausgefällt und wieder über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der mit Petroläther ausgefällte Niederschlag wurde wieder abgesaugt und getrocknet. Im Rotationsverdampfer wurde das Aceton-Petroläthergemisch abgezogen, wodurch aus der Mutterlauge auch noch die letzten Anteile des nicht ausgefällten, ungereinigten Andromedotoxins wiedergewonnen werden konnten. Diese wurden auf die gleiche Weise erneut gereinigt. Durchschnittlich waren fünf bis sechs Umkristallisationen erforderlich, um das Andromedotoxin rein zu erhalten. Der in der Literatur von Wood (1) angegebene Schmelzpunkt von $260 - 270^{\circ}\text{C}$ wurde nur annähernd erreicht.

Das gereinigte Andromedotoxin wurde in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Ausfällens teils als durchsichtige, dünne, 1 - 2 mm lange Nadeln, teils als kristallines weißes Pulver erhalten. Sämtliche Schmelzpunktbestimmungen wurden mit dem Schmelzpunktmikroskop (Leitz, Wetzlar) vorgenommen. Schmelzpunkte des Andromedotoxins aus den verschiedenen gereinigten Fraktionen:



245 - 249°C,

242 - 251°C,

253 - 258°C,

257 - 259°C,

254 - 260°C.

2. Hydrolyse des Andromedotoxins zu Andromedol (Vorschrift: nach Wood (1))

Eine Lösung von 3 Teilen Andromedotoxin und 15 Teilen Kaliumhydroxyd in 135 Teilen Aqua dest. und 30 Teilen Äthanol wurde 2 Stunden lang am Rückfluß erhitzt und die abgekühlte Mischung danach 30 Minuten lang mit 100 Teilen Amberlite ICR-50 geschüttelt. Als die Lösung nahezu neutral war, wurde das Austauscherharz abgetrennt und die wäßrige Lösung unter vermindertem Druck im Rotationsverdampfer konzentriert. Als Rückstand blieb eine weiße amorphe Substanz.

Zur Reinigung des Hydrolyseproduktes wurde es in Essigester umkristallisiert.

Das aus der Umkristallisation erhaltene Andromedol war eine weiße makroskopisch amorphe Substanz, die sich kurz vor dem Schmelzen in kleine Nadelchen umwandelte. Diese Umwandlung trat zwischen 160 - 180°C ein, bei welcher Temperatur auch der Austritt des in den Kristallen enthaltenen Lösungsmittels beobachtet wurde.

Die Ausbeute betrug etwa 33 %.

Gefundener Schmelzpunkt des Andromedols: 210 - 252°C.

Schmelzpunkt nach Wood: 225 - 257°C (1).

Der Versuch an weißen Mäusen ergab, daß Andromedol qualitativ wie Andromedotoxin wirkt. Näheres, auch über die Wirkungsstärke, siehe unten.

Zur Sicherung der Identität des Andromedotoxins und des Androme-

Andromedol

10.0

10.0

10.0
10.0



dols wurden die im Abschnitt 3 und 4 beschriebenen Versuche ausgeführt.

3. Dünnschicht-Chromatographie von Andromedotoxin und Andromedol

Die Dünnschichtplatten wurden mit dem Streichgerät (Desaga) mit einer Aufschwemmung von 25 gr. Kieselgel-G (Merck) in 50 ml. Wasser bestrichen, im Trockenschrank bei 105°C getrocknet und unter Abschluß von Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Die in Essigester gelösten Substanzen wurden mit einem Kapillarröhrchen in einem Abstand von etwa 1 - 2 cm punktförmig aufgetragen. Gleichzeitig mit den zu untersuchenden Substanzen liefen Vergleichssubstanzen bekannter Zusammensetzung mit.

Als Eluierungsmittel diente ein Aceton-Petroläthergemisch im Verhältnis 1 : 1. Besprüht wurde mit konzentrierter Schwefelsäure; es traten gelblichbraune Flecke unbekannter Zusammensetzung auf, die sich nach einiger Zeit erst rot, dann blau färbten.

Als weiteres Sprühmittel wurde eine Reagenzlösung, bestehend aus 0,75 % reinem p-Hydroxybenzaldehyd (Fp. : 116°C) in 40%iger Schwefelsäure (13), verwendet. (Anfertigung: 75 mg p-Hydroxybenzaldehyd gelöst in 4 ml. Schwefelsäure, dann aufgefüllt mit 6 ml. Aqua dest. auf 10 ml.) Dieses Sprühreagenz gibt mit Andromedotoxin und Derivaten eine Blaufärbung, ebenfalls unbekannter Zusammensetzung.

Rf-Werte: Andromedotoxin: Rf = 0,52

Andromedol: Rf = 0,32

4. Acetylierung von Andromedol in Pyridin

1. Versuch:

Vorschrift: nach Wood modifiziert (1).

10 mg. Andromedol wurden mit 0,1 gr. Essigsäureanhydrid und 0,008 gr. Natriumacetat in 1,2 ml. wasserfreiem Pyridin am Rückfluß im Wasserbad erhitzt. Alle 30 Minuten wurde eine Probe entnommen und auf eine Kieselgel-G-Platte aufgetragen, um den Fortgang der Umsetzung chromatographisch zu verfolgen.

Nach 60 Minuten entsprach der Rf-Wert dem des Andromedotoxins. Die abgekühlte Mischung wurde mit 10 ml. Eiswasser versetzt und das Produkt nach 2 Stunden sechsmal mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden gesammelt und mit Natriumbikarbonatlösung und Aqua dest. im Schütteltrichter gewaschen. Der gewaschene Chloroformextrakt wurde dann mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, das Chloroform im Rotationsverdampfer abgezogen. Die zurückbleibende weiße Substanz wurde dann aus Essigester umkristallisiert. Nach nochmaliger Umkristallisation aus Essigester wurde eine weiße kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 236 - 246°C erhalten. Es wurde mit gereinigtem Andromedotoxin ein Mischschmelzpunkt bestimmt:

Schmelzpunkt des erhaltenen Produktes: 236 - 246°C.

Schmelzpunkt von Andromedotoxin: 242 - 251°C.

Mischschmelzpunkt: 232 - 248°C.

Zusammenfassung: Rf = 0,52 = Rf-Wert des Andromedotoxins.

Schmelzpunkt: 236 - 246°C.

Die Ausbeute war gering.

2. Versuch:

Vorschrift: entsprechend dem 1. Versuch, mit dem Unterschied, daß 2 Stunden am Rückfluß erhitzt wurde.

Es wurden zwei Fraktionen erhalten.

Die eine Fraktion löste sich in Essigester und ließ sich daraus auskristallisieren.

Bei der Chromatographie traten vier Flecke auf, von denen nur die beiden ersten deutlich sichtbar waren.

Rf: 1) $R_f = 0,52$. Dieser Wert entspricht dem R_f -Wert des Andromedotoxins.

2) $R_f = 0,76$. Dieser Wert entspricht, wie unten gezeigt wird, dem R_f -Wert des Diacetyl-andromedols.

3) $R_f = 0,86$.

4) $R_f = 0,92$.

Der Schmelzpunkt, der bei $230 - 238^{\circ}\text{C}$ gefunden wurde, ist ein Mischschmelzpunkt dieser vier im Chromatogramm nachgewiesenen Substanzen. Daraus erklärt sich die Erniedrigung des gefundenen Schmelzpunktes gegenüber dem des gereinigten Andromedotoxins, der bei $254 - 260^{\circ}\text{C}$ lag.

Trotz weitgehender Übereinstimmung der chemischen Eigenschaften der gewonnenen Substanz mit denen des natürlich vorkommenden Andromedotoxins erwies sie sich als pharmakologisch unwirksam. Die zweite Fraktion, die gefunden wurde, war in Aceton löslich. Bei der Chromatographie traten drei Flecke auf, von denen nur der erste deutlich sichtbar war.

Rf: 1) $R_f = 0,52$. Dieser Wert entspricht dem R_f -Wert des Andromedotoxins.

2) $R_f = 0,76$.

3) $R_f = 0,86$.

Auch diese Substanz war pharmakologisch nicht wirksam. Es blieb ein in Essigester und Aceton unlöslicher Rückstand mit einem Schmelzpunkt von $282 - 285^{\circ}\text{C}$ und einem R_f -Wert von $0,54$.

3. Versuch:

Vorschrift: nach Wood (1) modifiziert.

50 mg. Andromedol wurden mit 0,5 ml. Essigsäureanhydrid in 3,6 ml. wasserfreiem Pyridin 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde mit 10 ml. Aqua dest. versetzt und 15 Minuten lang gerührt, dann im Rotationsverdampfer eingengt. Als Rückstand blieb eine weiße amorphe Substanz, die beim chromatographischen Vergleich mit den bekannten Substanzen auf eine Mischung von Andromedol, Monoacetylandromedol und Diacetylandromedol hinwies.

Schmelzpunkt dieser Substanz: $264 - 269^{\circ}\text{C}$.

Die Isolierung erfolgte chromatographisch.

Es wurde eine Fraktion A mit einem Rf-Wert von 0,52 gewonnen. Diese ergab nach nochmaliger Reinigung über die Platte die Fraktionen B und C. Der Rf-Wert der Fraktion B war 0,44, der Schmelzpunkt lag bei $274 - 282^{\circ}\text{C}$. Diese Substanz zeigte im Mäusetest keine Wirkung.

Fraktion C konnte nicht isoliert werden. Der Rf-Wert = 0,52 entspricht nahezu dem des Andromedotoxins.

Ferner wurde eine Fraktion D gefunden, die sich ebenfalls nicht isolieren ließ. Der Rf-Wert = 0,75 entspricht weitgehend dem des Diacetylandromedols.

Es darf angenommen werden, daß es sich bei den in den drei Versuchen gewonnenen Substanzen um ein Monoacetylderivat des Andromedols handelt.

Da eine biologische Wirksamkeit nicht festzustellen war, kann vermutet werden, daß die Acetylierung des Andromedols nicht, wie es bei der natürlich vorkommenden Verbindung der Fall ist, an der OH-Gruppe an C14 eintrat, sondern an einer anderen OH-Gruppe.

Zur Charakterisierung dieser Monoacetylverbindung des Andromedols können folgende Ergebnisse herangezogen werden:

1. Bei der Adsorptionschromatographie ist die Reihenfolge bei der Trennung der Substanzen durch die Polarität ihrer Verbindungen bestimmt (14). Besitzt ein Molekül zahlreiche polare Substituenten, so ist die Adsorption der Substanz größer, d.h. die Laufstrecke auf der Platte kürzer.

Wird diese Erfahrung auf das Andromedotoxin angewandt, so bedeutet dieses, daß Derivate mit der gleichen Anzahl freier Hydroxylgruppen im gleichen Lösungsmittel annähernd die gleichen Rf-Werte haben müssen. Der Rf-Wert des Monoacetylderivates, der dem des natürlich vorkommenden Andromedotoxins weitgehend nahek kommt, weist darauf hin, daß in diesem Molekül, ebenso wie in der natürlichen Verbindung, fünf freie OH-Gruppen vorhanden sind.

2. Für die Acetylierung des Andromedols kommen nur die sekundären OH-Gruppen an C3, C6 und C14 in Frage. Sekundäre OH-Gruppen sind reaktiver als tertiäre, welche immer sterisch etwas behindert sind (15). Die an C14 acetylierte, in der Natur vorkommende Verbindung ist im Tierversuch wirksam. Das Monoacetylderivat des Andromedols ist in angemessenen Dosen jedoch pharmakologisch unwirksam. Es läßt sich daraus folgern, daß die sekundäre OH-Gruppe in C14-Stellung für die Acetylierung ausscheidet.

3. Die an C5 und C6 sitzenden OH-Gruppen gehören einer Glykolstruktur an. Bei der Oxydation mit Perjodsäure werden nur freie Glykolstrukturen angegriffen.

Das Monoacetylderivat des Andromedols wurde mit Natriumperjodat behandelt, es trat aber keine Reaktion ein. Wäre eine Aufspaltung an dieser Stelle des Moleküls erfolgt, so hätte sich das Oxydationsprodukt chromatographisch anders verhalten



6-Acetylandromedol

471

scale 1

4.1.2
Hardenham

müssen als die Ausgangssubstanz; dies war aber nicht der Fall. Es konnte keine Änderung in der chemischen Reaktionsweise nachgewiesen werden, was als Beweis dafür gewertet werden kann, daß die OH-Gruppe in C6-Stellung nicht mehr frei, sondern durch die Acetylgruppe besetzt ist.

Demnach handelt es sich bei dem erhaltenen Monoacetylderivat um das 6-Acetylandromedol.

5. Acetylierung von Andromedotoxin in Pyridin

Vorschrift: nach Wood modifiziert (1)

Eine Mischung von 100 mg Andromedotoxin, 1 ml. Essigsäureanhydrid und 0,04 gr. getrocknetem Natriumacetat wurden in 12 ml. wasserfreiem Pyridin auf dem Wasserbad am Rückfluß 1 Stunde lang erhitzt. Die abgekühlte Mischung wurde mit 40 ml. Eiswasser versetzt und 2 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurde viermal mit 5 ml. Chloroform extrahiert, die Chloroformextrakte vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rückstand blieb eine weiße Substanz, die in Aceton aufgenommen und durch Zugabe von Petroläther als weiße kristalline Nadeln ausgefällt wurde.

Schmelzpunkt: $236 - 242^{\circ}\text{C}$. (Literatur: $246 - 247^{\circ}\text{C}$ (1))

Rf-Wert: $R_f = 0,75$.

Es wurde angenommen, daß die erhaltene Substanz Diacetylandromedol ist (Formel siehe unter Diskussion).

Im Tierversuch war eine pharmakologische Wirkung in angemessenen Dosen nicht nachweisbar.

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Produkt wieder der Hydrolyse unterworfen.



6. Hydrolyse der Diacetylverbindung

Vorschrift: nach Wood (1)

Eine Mischung von 0,02 gr. Diacetyl-andromedol und 0,06 gr. Kaliumhydroxyd in 0,9 ml. Aqua dest. und 0,2 ml. Äthanol wurde 2 Stunden lang am Rückfluß erhitzt und die abgekühlte Mischung zur Neutralisation mit 1 gr. Amerlite ICR-50 unter Zugabe von einigen ml. Aqua dest. behandelt. Nach 30 Minuten Schütteln war die Lösung nahezu neutral, das Austauscherharz wurde abgetrennt und die wäßrige Lösung im Rotationsverdampfer eingedunstet. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und mit Petroläther ausgefällt. Es wurde eine Substanz erhalten, die aus länglichen kristallinen Nadeln bestand. Die Substanz war nicht einheitlich; es wurden chromatographisch Andromedotoxin und Andromedol nachgewiesen. Für die Uneinheitlichkeit der Substanz spricht auch die Schmelzpunktdepression, der Schmelzpunkt ergab $224 - 246^{\circ}\text{C}$.

Rf-Wert: 1) Kleiner Fleck: $R_f = 0,56$. Der Wert entspricht annähernd dem R_f -Wert des Andromedotoxins.

2) Großer Fleck: $R_f = 0,32$. Der Wert entspricht weitgehend dem R_f -Wert des Andromedols.

Es ist anzunehmen, daß der größte Teil zu Andromedol hydrolysiert wurde. Die gesamte Substanz war qualitativ und quantitativ entsprechend pharmakologisch wirksam.

7. Versuche über die Dehydratisierung des Andromedols zu Monoanhydroandromedol und Dianhydroandromedol

Formeln siehe unter Diskussion.

1. Versuch:

Vorschrift: nach Wood (1) modifiziert.

Eine Mischung von 100 mg. Andromedol, 25 ml. wasserfreiem Dioxan und 4,2 gr. wasserfreiem Kupfersulfat wurde 6 Stunden lang am Rückfluß erhitzt.

Die festen Bestandteile wurden abfiltriert, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rückstand blieb ein braunrotes harziges Produkt, das mit Essigester aufgenommen wurde. Die Lösung wurde auf eine Kieselgel- G_F -Platte aufgetragen und mit einem Aceton-Petroläther-Gemisch im Verhältnis 1 : 1 eluiert. Als Sprühmittel wurde p-Hydroxybenzaldehyd, gelöst in 40%iger Schwefelsäure, genommen.

Das Produkt wurde durch Umkristallisieren in Essigester gereinigt. Schmelzpunkt: etwa 90°C .

Bei der Chromatographie wurden zwei Flecke erhalten:

1) $R_f = 0,56$.

2) $R_f = 0,74$.

Im Tierversuch zeigte das erhaltene Produkt in angemessenen Dosen keine pharmakologische Wirkung.

2. Versuch:

10 mg. Andromedol wurden in 2,5 ml. wasserfreiem Dioxan mit 50 mg. getrocknetem Natriumsulfat und einer Spur elementaren Jods ein paar Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nachdem nach 12 Stunden noch keine Reaktion eingetreten war (Nachweis erfolgte chromatographisch), wurde die Lösung unter Zugabe von einer Spur entwässerten Kupfersulfats 2 Stunden lang am Rückfluß erhitzt.

Die Weiterbehandlung erfolgte wie in Versuch 1 beschrieben.

Schmelzpunkt: etwa 90°C .

Rf-Wert: 1) $R_f = 0,58$.

2) $R_f = 0,75$.

Angemessene Dosen der Substanz zeigten keine pharmakologische Wirkung.

3. Versuch:

120 mg. Andromedol wurden mit 40 ml. Aceton und 5 gr. wasserfreiem Kupfersulfat auf dem Wasserbad 12 Stunden lang an Rückfluß erhitzt, das Filtrat im Vakuum eingeengt. Es blieb eine rotbraune harzige Masse. Diese wurde mit Essigester aufgenommen und durch Umkristallisieren gereinigt.

Schmelzpunkt: etwa 90°C .

Rf-Wert: $R_f = 0,81$.

Die Substanz war in angemessenen Dosen pharmakologisch nicht wirksam.

Es kann vermutet werden, daß bei der in Versuch 3 beschriebenen Versuchsanordnung das Isopropylidenanhydroderivat des Andromedols gewonnen wurde. Der Rf-Wert von $R_f = 0,81$ spricht dafür, daß mehrere OH-Gruppen blockiert sind; der Schmelzpunkt von 90°C entspricht annähernd dem von Iwasa und Mitarbeitern (2) für dieses Derivat gefundenen von $108 - 109^{\circ}\text{C}$.

Diese Verbindung wurde nicht weiter untersucht.

4. Versuch:

50 mg. Andromedol wurden in 12,5 ml. wasserfreiem Dioxan mit 2,5 gr. entwässertem Kupfersulfat 8 Tage lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rückstand blieb eine leicht bräunliche harzige Substanz zurück. Diese wurde in Essigester gelöst und durch Umkristallisieren gereinigt.

Bei der Chromatographie wurden zwei Flecke gefunden.

Die Isolierung erfolgte chromatographisch über eine Dickschicht-

Platte. Die beiden Substanzen, die sich gewinnen ließen, wurden als Substanz E und Substanz F bezeichnet.

Schmelzpunkt: Substanz E: 105 - 110°C.

Substanz F: 200 - 220°C.

Rf-Werte: Substanz E: Rf = 0,58.

Substanz F: Rf = 0,79.

Beide Substanzen waren im Tierversuch wirksam.

Im folgenden 5. Versuch wurde das Verfahren des 4. Versuches leicht abgeändert.

5. Versuch:

100 mg. Andromedol wurden in 25 ml. wasserfreiem Dioxan mit 5 gr. entwässertem Kupfersulfat 2 Stunden lang am Rückfluß bei etwa 80°C erhitzt, dann noch 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand, eine gelbe harzige Substanz, wurde mit wenig Aceton aufgenommen.

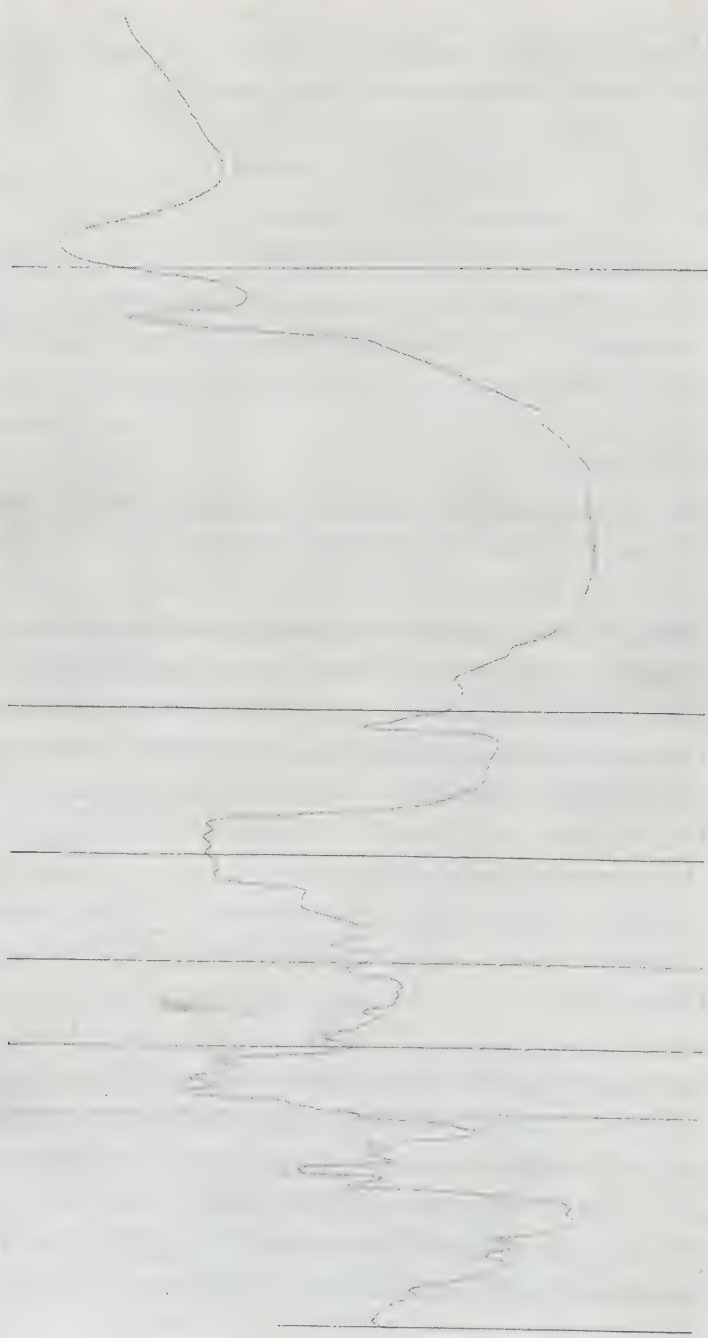
Chromatographisch (Kieselgel-G_F-Platte, Sprühmittel: p-Hydroxybenzaldehyd-Schwefelsäure) ließen sich vier Fraktionen unterscheiden, die über eine Dickschicht-Platte getrennt und als Substanzen E, F, G und H bezeichnet wurden.

Im pharmakologischen Versuch erwiesen sich die Substanzen E und F qualitativ als wirksam, die Substanzen G und H wurden unwirksam gefunden.

Aufarbeitung der Substanzen E und F:

Die Substanzen E und F wurden nochmals chromatographisch gereinigt und mit warmem Aceton eluiert. Das Lösungsmittel wurde mit dem Rotationsverdampfer entfernt. Es blieb bei beiden Substanzen wieder ein leicht gelblicher harziger Rückstand, der mit 2 - 3 Tropfen getrocknetem Essigester aufgenommen wurde. Durch Zugabe

Anhydroandromedol



K₂S₈

3.14 g

27.40 g
C₂

TABELLE 1

Übersicht über die Schmelzpunkte und Rf-Werte

von Andromedotoxin und Derivaten

- 25 -

	<u>Gefundener Schmelzpunkt</u>	<u>Schmelzpunkt n. Iwasa (2)</u>	<u>Rf-Wert</u>
Andromedotoxin	254 - 260°	271°	0,52
Andromedol	225 - 257°	215°	0,32
6-Acetylandromedol	236 - 246°	-	0,52
Diacetylandromedol	236 - 242°	-	0,75
Monoanhydroandromedol	188°	198°	0,48 - 0,52

von Petroläther wurde in beiden Fällen eine weiße amorphe Substanz gewonnen, die nach Entfernung des Lösungsmittels im evakuierten Exsikkator getrocknet wurde.

Schmelzpunkte: Substanz E: $115 - 120^{\circ}\text{C}$.

Substanz F: $210 - 220^{\circ}\text{C}$.

Rf-Werte: Substanz E: $R_f = 0,48 - 0,52$.

Substanz F: $R_f = 0,72$.

Weitere Charakterisierung der Substanzen E und F:

1. UV-Lampe: bei Substanz F war deutliche Fluoreszenzlösung des Fluoreszenzindikators auf der Platte (Kieselgel- G_F -Platte) zu sehen, die bei Substanz E schwächer sichtbar wurde.
2. Besprühen der Platte mit Osmiumtetroxyd, einem Reagenz, mit dem sich isolierte Doppelbindungen nachweisen lassen: schwache Schwarzfärbung am Fleck der Substanz E, starke Schwarzfärbung am Fleck der Substanz F.
Diese Reaktionen beweisen das Vorliegen von Doppelbindungen im Molekül.
3. Der R_f -Wert von $R_f = 0,48 - 0,52$ der Substanz E, der dem des Andromedotoxins naheliegt, spricht für das Vorliegen von fünf freien OH-Gruppen im Molekül.
4. Der Schmelzpunkt, der bei Substanz E nach Reinigung über die Dickschicht-Platte bei $115 - 120^{\circ}\text{C}$ gefunden wurde, konnte nach mehrmaligem Umkristallisieren in Aceton und Ausfällen mit Petroläther auf 188°C gebracht werden. (Literatur: 198°C für Monoanhydroandromedol nach Iwasa (2)).

Substanz E ist mit großer Wahrscheinlichkeit identisch mit der in der Literatur (2) beschriebenen Monoanhydroverbindung des Andromedols.

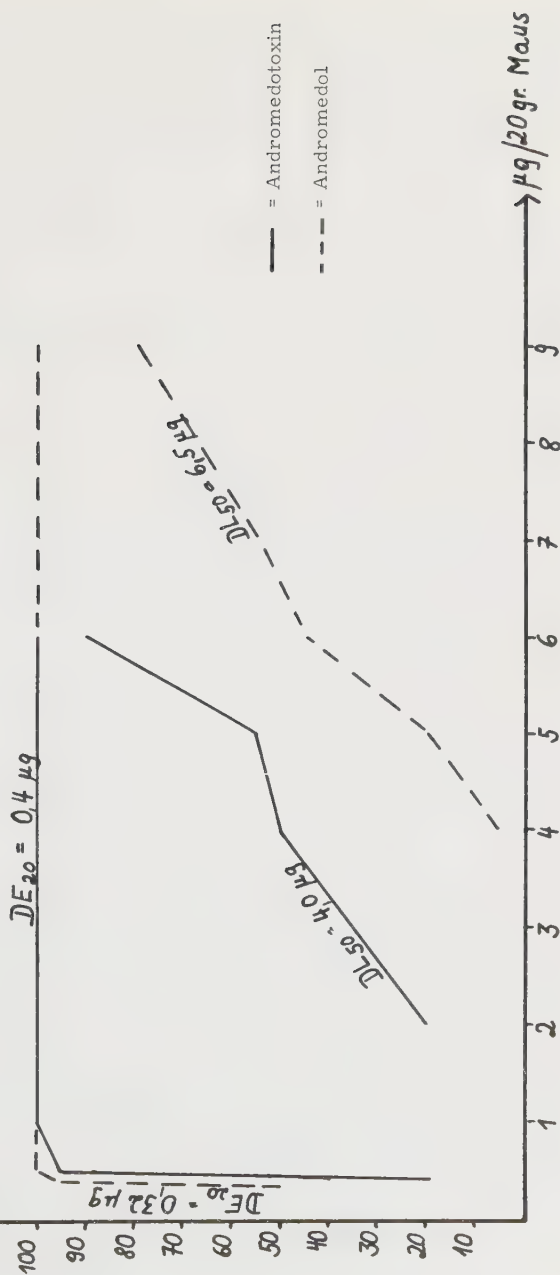
Bei nochmaliger Testung im Tierversuch waren die beiden nunmehr gereinigten Substanzen E und F wirkungslos.

ABBILDUNG 1

Dosiswirkungskurven von Andromedotoxin (Schmpkt: 251 - 253°) und
=====

Andromedol (Schmpkt: 210 - 247°)
=====

Zahl der eingegangenen
Tiere in % und Zahl der
reagierenden Tiere.



Der oben beschriebene Befund einer Wirksamkeit der noch unzureichend gereinigten Substanzen erklärt sich durch Beimengungen von Ausgangssubstanz, d.h. Andromedol.

B. PHARMOKOLOGISCHE VERSUCHE

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurde die pharmakologische Wirksamkeit der in dem chemischen Teil der Arbeit hergestellten Substanzen an männlichen weißen Mäusen, die aus der Zucht der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten in Tübingen stammen, getestet. Das Gewicht der Versuchstiere betrug 17 - 38 gr. Zu den vergleichenden Versuchen wurden Gruppen von Mäusen von annähernd gleichem Gewicht gebildet.

Für die zur Injektion bestimmte Lösung wurde 1 mg. der Substanzen in 20 ccm 0,85 %iger NaCl-Lösung gelöst. Diese Stammlösung, die bis zum Verbrauch im Kühlschrank aufbewahrt wurde (nie länger als 8 Stunden), enthielt 50 µg/ml Wirksubstanz. Verwendet wurde eine Tuberkulinspritze, bei der 100 E = 1 ml. und 10 E = 0,1 ml. entsprachen. Daraus folgt, daß 0,1 ml. 5 µg der Wirksubstanz enthielten. Die injektionsfertigen Lösungen wurden durch Verdünnung mit 0,85 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Davon erhielten die Versuchstiere 0,1 ml. pro 20 gr. Mausgewicht intravenös in die Schwanzvene. Bei den Versuchen wurde die Zahl der reagierenden Tiere und außerdem die Zahl der aufgetretenen RZ (=Respirationszeichen) festgestellt, die Körpertemperatur vor der Injektion und nach Aufhören des Respirationszeichens rektal gemessen und die Speichelsekretion beobachtet.

1. Versuche mit Andromedotoxin

Methodik:

Bei den Mäusen wurde rektal (mit dem "Thermorapid" der Fa. Netheler u. Hinz) die Körpertemperatur gemessen, dann die berechnete Dosis Andromedotoxin in die Schwanzvene injiziert und sofort, unter Registrierung der Zeit, die bis zum Auftreten des ersten RZ verstreicht (Latenz), mit der Auszählung der RZ begonnen. Dann wurde die Körpertemperatur noch einmal rektal gemessen.

Bestimmung der Wirkdosis des Rohextraktes von Andromedotoxin:

Die niedrigste Dosis des Rohextraktes von Andromedotoxin, bei der die Tiere ein deutliches RZ machten, war $4 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ Die Zahl der RZ pro Maus lag bei dieser Dosierung bei 4 - 8 RZ. Zwei der drei für diesen Versuch verwendeten Tiere zeigten Salivation.

Bestimmung der Wirkung von gereinigtem Andromedotoxin:

Es wurden neun Versuchsreihen mit je 20 Mäusen und in aufsteigender Dosierung von $0,4 \mu\text{g}$ bis $6,0 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ Andromedotoxin ausgeführt.

Es wurden Dosiswirkungskurven durch Bestimmung der Wirkung mehrerer Punkte aufgestellt. Durch graphische Darstellung der Versuchsergebnisse wurden die DE_{20} (=Effektivdosis) und die DL_{50} (=Letaldosis) bestimmt.

Bei der Dosierung von $0,4 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ zeigten vier von den 20 Versuchstieren (20 %) eine RZ-Wirkung. Die Zeit, in der die Tiere RZ machten, lag zwischen 1 und $1 \frac{1}{2}$ Minuten. Bei sieben Tieren (35 %) trat Salivation auf. Die Körpertemperatur verhielt sich uneinheitlich, bei 16 Tieren (80 %) war eine geringe Steigerung, bei vier Tieren (20 %) eine leichte Senkung zu beobachten.

TABELLE 2

Auswertung der pharmakologischen Versuche mit Andromedotoxin

Dosis/ 20 gr. Kö.-gew. µg	positiv waren	RZ-Mittel- werte (X)	Mittlere Latenz (sec.)	RZ/Min.	Salivat.	Krämpfe	Exitus
<u>0,4</u>	20 %	1,05 ± 0,5 5,25 ± 1,4	22,5 ± 2,5	4,2	35 %	-	-
<u>0,45</u>	60 %	6,6 ± 1,2 11 ± 1,7	19,6 ± 3,6	4,7	55 %	-	-
<u>0,5</u>	95 %	14,7 ± 1,9 15,4 ± 2	21,8 ± 2,5	6,5	75 %	-	-
<u>1,0</u>	100 %	38,8 ± 2,6	11,6 ± 2,1	6	75	5 %	-
<u>2,0</u>	100 %	37,9 ± 6,6 45,8 ± 7,1	2 ± 0,2	2,9	70 %	75 %	20 %
<u>3,0</u>	100 %	58,4 ± 10,8 85,5 ± 10,5	1,9 ± 0,3	2,8	70 %	100 %	35 %
<u>4,0</u>	100 %	59,2 ± 15 113,3 ± 17,4	1,5 ± 0,2	2,9	55 %	100 %	50 %
<u>5,0</u>	100 %	36,4 ± 8,7 73 ± 8,8	1,2 ± 0,1	2,3	80 %	100 %	55 %
<u>6,0</u>	100 %	9,4 ± 4,9 73 ± 15	1	1,5	95 %	100 %	90 %

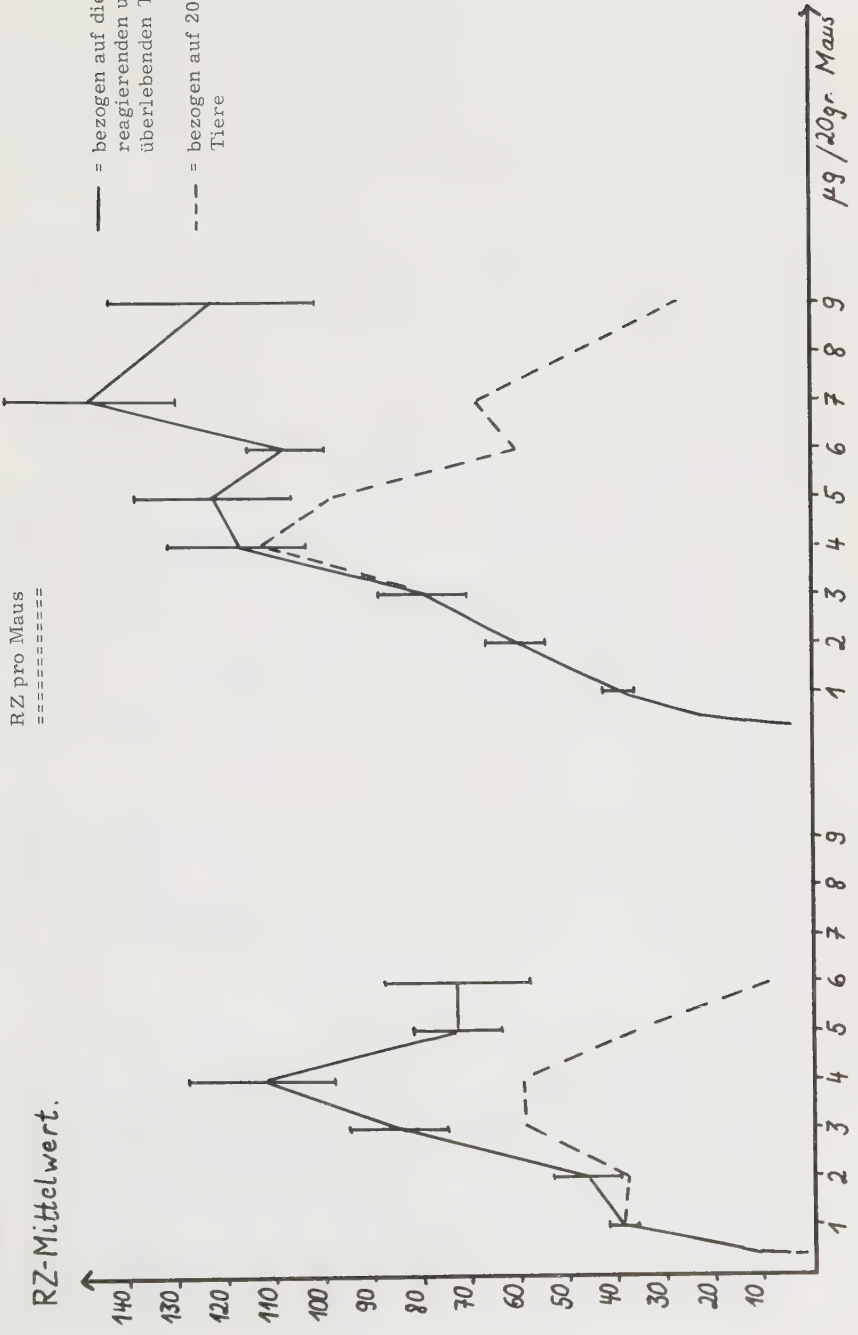
(X) = obere Zahl: bezogen auf 20 Tiere

untere Zahl: bezogen auf die reagierenden und überlebenden Tiere.

ABBILDUNG 2

RZ pro Maus
=====

RZ-Mittelwert.



Die RZ-Wirkung nahm bei der Dosis von 0,45 $\mu\text{g}/20$ gr. erheblich zu, es reagierten 11 von 20 Tieren (55 %) positiv. Die Dauer der RZ-Wirkung lag zwischen 1 und 4 Minuten. 11 Tiere (55 %) zeigten Salivation. Die Körpertemperatur war auch hier noch uneinheitlich, sechs Tiere (30 %) zeigten geringe Temperaturerhöhung, ein Tier (5 %) keine Veränderung und 13 Tiere (65 %) eine Senkung.

Nach 0,5 $\mu\text{g}/20$ gr. reagierten bereits 19 Tiere (95 %) mit dem RZ, die Dauer der RZ-Wirkung lag zwischen 1 und 4 Minuten, bei 15 Tieren (75 %) konnte Salivation beobachtet werden. Die Körpertemperatur zeigte bei sechs Versuchstieren (30 %) eine geringe Steigerung, bei drei Tieren (15 %) keine Veränderung und bei 11 Tieren (55 %) eine Temperatursenkung.

Wurde 1 $\mu\text{g}/20$ gr. injiziert, zeigten alle 20 Versuchstiere (100 %) eine RZ-Wirkung, die Dauer der Wirkung lag zwischen 4 und 10 Minuten. Salivation trat bei 15 Tieren (75 %) auf, eine Maus (5 %) zeigte Exzitation und geringgradige Krämpfe. Bei einem Tier (5 %) wurde eine minimale Erhöhung der Körpertemperatur, bei einem Tier (5 %) keine Veränderung, und bei 18 Tieren (90 %) eine eindeutige Senkung beobachtet.

Nach 2 $\mu\text{g}/20$ gr. machten alle Tiere das RZ, die RZ-Wirkung dauerte bei den überlebenden Tieren 1 bis 28 Minuten. Salivation wurde bei 14 Tieren (70 %) beobachtet, Exzitation und Krämpfe bei 15 Tieren (75 %). Vier Versuchstiere (20 %) gingen nach 1 - 2 Minuten ein. Alle Tiere zeigten eine deutliche Senkung der Körpertemperatur.

3 $\mu\text{g}/20$ gr. löste bei allen Versuchstieren das RZ aus, dessen Dauer zwischen 10 und 41 Minuten lag. Salivation und Krämpfe wurden bei allen Tieren beobachtet. Sieben Tiere (35 %) gingen innerhalb von 1 - 3 Minuten ein. Eine Senkung der Körpertemperatur um durchschnittlich 3,2^oC trat bei allen überlebenden Tieren ein.

Nach 4 μg und 5 $\mu\text{g}/20$ gr. zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die RZ-Wirkung trat bei allen Tieren auf, die Dauer der Wirkung steigerte

TABELLE 3

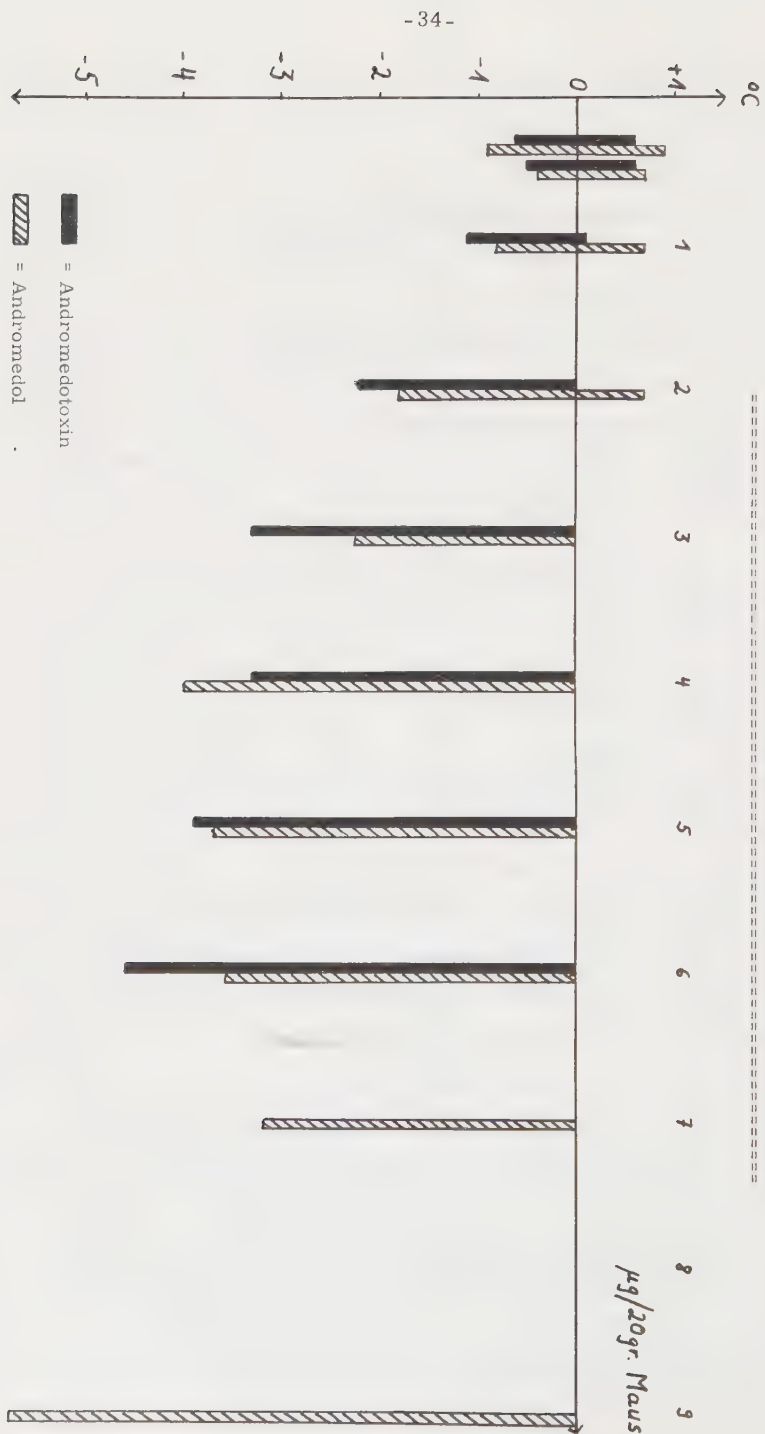
Auswertung der Körpertemperaturmessung

Versuche mit Andromedotoxin

Dosis/ 20 gr. Kö. -gew. µg	Temperaturerhöhung zeigten:	keine Temperatur- veränderung	Temperatursenkung zeigten:
<u>0,4</u>	80 % um: $0,6 \pm 0,08$	-	20 % um: $0,8 \pm 0,03$
<u>0,45</u>	30 % um: $0,35 \pm 0,08$	5 %	65 % um: $0,76 \pm 0,05$
<u>0,5</u>	30 % um: $0,6 \pm 0,2$	15 %	55 % um: $0,41 \pm 0,06$
<u>1,0</u>	5 % um: 0,1	5 %	90 % um: $1,1 \pm 0,18$
<u>2,0</u>	-	-	100 % um: $2,25 \pm 0,28$
<u>3,0</u>	-	-	100 % um: $3,2 \pm 0,08$
<u>4,0</u>	-	-	100 % um: $3,34 \pm 0,5$
<u>5,0</u>	-	-	100 % um: $3,9 \pm 0,9$
<u>6,0</u>	-	-	100 % um: 4,65

ABBILDUNG 3

Veränderung der Körpertemperatur durch Andromedotoxin und Andromedol
=====



sich bis zu 49 Minuten. Salivation und Krämpfe waren bei allen Tieren vorhanden.

Bei der Dosierung von $4 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ gingen 10 Tiere (50 %) ein, bei der Dosierung von $5 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ 11 Tiere (55 %).

Die Senkung der Körpertemperatur betrug durchschnittlich $3,34^{\circ}$ und $3,9^{\circ}$.

Nach $6 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ gingen 18 der Versuchstiere (90 %) nach 20 Sekunden bis 4 Minuten zugrunde, zwei (10 %) überlebten. Diese beiden Tiere krampften stark und hatten eine Senkung der Körpertemperatur um etwa $4,65^{\circ}$.

Aus Abbildung 1 geht hervor, daß die DE_{20} des Andromedotoxins bei $0,4 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$, die DE_{50} bei $0,48 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ und die DL_{50} bei $4 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ lag. Die Latenzzeit nimmt (Tabelle 2) mit höherer Dosierung ab, ebenso die Zahl der RZ pro Minute und Maus. Diese Erscheinungen dürften jedoch nicht darauf zurückzuführen sein, daß die RZ-Wirkung mit der höheren Dosierung abnimmt, sondern darauf, daß die Tiere schon nach wenigen RZ und einem kurzen Exzitationsstadium in einen Krampfzustand verfielen, aus dem sie sich erst nach einigen Minuten erholten. In dem nachfolgenden paralytischen Stadium war offensichtlich durch Lähmung der motorischen Funktionen die RZ-Wirkung stark beeinträchtigt. Daher zeigt der Verlauf der Wirkungskurve (RZ pro Maus) in Abbildung 2 ein Maximum bei $4 \mu\text{g}$ und danach einen starken Abfall.

Abbildung 3 gibt den Wirkungsverlauf im Hinblick auf die Körpertemperatur wieder. Eine Erklärung für die bei mehreren Mäusen nach kleinen intravenösen Dosen von Andromedotoxin beobachtete Steigerung der Körpertemperatur könnte in einer Erregung der Kaltrezeptoren in der Peripherie gesucht werden. Hohe Dosen dagegen können infolge Hemmung zentral-nervöser Mechanismen zu einer vorübergehenden Lähmung der gesamten Temperaturregula-

tion und damit zu einem Absinken der Körpertemperatur führen.

2. Versuche mit Andromedol

Methodik:

Die Versuche wurden in der gleichen Weise ausgeführt, wie sie bei der vorhergehenden Versuchsreihe mit Andromedotoxin beschrieben wurden.

Bestimmung der Wirkung von gereinigtem Andromedol:

Es wurden elf Versuchsreihen mit je 20 Mäusen in aufsteigender Dosierung von 0,3 μg bis 9,0 $\mu\text{g}/20$ gr. Andromedol ausgeführt. Es wurden wieder die DE_{20} , die DE_{50} und die DL_{50} bestimmt, wie bei Andromedotoxin.

Bei der Dosierung von 0,3 $\mu\text{g}/20$ gr. Andromedol zeigte noch keines der 20 Versuchstiere eine RZ-Wirkung, doch nach 0,35 $\mu\text{g}/20$ gr. reagierten bereits 10 Tiere (50 %) positiv. Die Dauer der RZ-Wirkung betrug 1 bis 2 Minuten. Salivation wurde bei dieser Dosierung noch nicht beobachtet. Die Körpertemperatur stieg bei 10 Tieren (50 %) gering an, bei 10 Tieren (50 %) trat eine leichte Senkung auf. Nach 0,4 $\mu\text{g}/20$ gr. reagierten schon 19 der 20 Versuchstiere (95 %) mit einer RZ-Wirkung, deren Dauer zwischen 2 und 4 Minuten lag. Salivation trat bei 11 Tieren (55 %) auf. Bei acht Tieren (40 %) wurde eine Erhöhung der Körpertemperatur, bei 12 Tieren (60 %) eine Senkung beobachtet.

Bei der Dosierung von 0,5 $\mu\text{g}/20$ gr. und 1 $\mu\text{g}/20$ gr. Andromedol zeigten alle Tiere die RZ-Wirkung. Die Zeit, in der die Tiere RZ machten, lag zwischen 1 und 10 Minuten. Salivation trat bei 0,5 $\mu\text{g}/20$ gr. bei 17 Tieren (85 %), bei 1 $\mu\text{g}/20$ gr. bei 11 Tieren (55 %) auf. Die Körpertemperatur war bei einem kleinen Teil der Tiere erhöht, bei dem größeren Teil gering gesenkt.

2 μg und 3 $\mu\text{g}/20$ gr. lösten bei allen Versuchstieren eine RZ-Wirkung aus, deren Dauer zwischen 6 und 41 Minuten lag. Salivation trat nach 2 $\mu\text{g}/20$ gr. bei 16 Tieren (80 %), nach 3 $\mu\text{g}/20$ gr. bei allen Versuchstieren auf. Nach 2 $\mu\text{g}/20$ gr. zeigten fünf Tiere (25 %) Exzitation und Krämpfe, nach 3 $\mu\text{g}/20$ gr. 15 Tiere (75 %). Die Körpertemperatur stieg nach 2 μg bei zwei Tieren (10 %) geringgradig an, bei 18 Tieren (90 %) sank sie um durchschnittlich $1,7^{\circ}$. Nach 3 μg wurde eine Senkung um $2,5^{\circ}$ festgestellt.

In der Dosierung von 4 $\mu\text{g}/20$ gr. ergaben sich ähnliche Verhältnisse, die RZ-Wirkung war bei allen Tieren positiv, die Dauer betrug zwischen 19 und 41 Minuten, Salivation trat bei allen Tieren auf, 17 Tiere (85 %) krampften und ein Tier (5 %) ging nach 1 Minute zugrunde. Die Körpertemperatur senkte sich bei allen Tieren um durchschnittlich $4,0^{\circ}$.

Nach 5 $\mu\text{g}/20$ gr. war die RZ-Wirkung bei allen Tieren positiv, die Zeit, in der die Tiere das RZ machten, lag zwischen 31 und 74 Minuten. Salivation wurde bei allen Tieren beobachtet, Exzitation und Krämpfe bei 19 Tieren (95 %). Vier Tiere (20 %) gingen nach 1 Minute ein. Die Senkung der Körpertemperatur betrug im Durchschnitt $3,7^{\circ}$. Bei der Dosierung von 6 μg und 7 $\mu\text{g}/20$ gr. zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die RZ-Wirkung war bei allen Tieren positiv, ebenso wurden Salivation und Krämpfe bei allen beobachtet. Die Dauer der RZ-Wirkung betrug zwischen 34 und 69 Minuten. Bei der Verabreichung von 6 μg gingen neun Tiere (45 %) zugrunde, bei der von 7 μg 11 Tiere (55 %) nach 30 Sekunden bis zu 7 Minuten. Die Körpertemperatur senkte sich nach 6 μg und 7 μg um durchschnittlich $3,6^{\circ}$ und $3,0^{\circ}$.

Nach 9 $\mu\text{g}/20$ gr. gingen 16 der 20 Versuchstiere (80 %) innerhalb von 30 Sekunden bis zu 7 Minuten zugrunde. Vier Tiere überlebten, diese machten auch RZ und fielen in einen langdauernden Krampfstand. Die Dauer der RZ-Wirkung betrug bis zu 80 Minuten. Bei

TABELLE 4

Auswertung der pharmakologischen Versuche mit Andromedol

Dosis/ 20 gr. Kö.-gew. µg	positiv waren	RZ-Mittel- werte	Mittlere Latenz (sec.)	RZ/ Min.	Salivat.	Krämpfe	Exitus
<u>0,35</u>	50 %	2 ± 0,6 4 ± 1	69 ± 4,8	2,8	-	-	-
<u>0,4</u>	95 %	13,5 ± 1,2 14,3 ± 1,2	31 ± 2,9	6,3	55 %	-	-
<u>0,5</u>	100 %	22,9 ± 2,5	23,5 ± 1,8	5,5	85 %	-	-
<u>1,0</u>	100 %	39,7 ± 2,9	24,4 ± 1,7	5,8	55 %	-	-
<u>2,0</u>	100 %	61 ± 6,4	11,3 ± 0,6	5	80 %	25 %	-
<u>3,0</u>	100 %	80,4 ± 9,3	6,6 ± 0,7	3,6	75 %	75 %	-
<u>4,0</u>	100 %	112,5 ± 14,2 118,2 ± 13,8	4,6 ± 0,5	3,9	100 %	85 %	5 %
<u>5,0</u>	100 %	99,2 ± 16,5 123 ± 15,6	3 ± 0,3	2,4	100 %	95 %	20 %
<u>6,0</u>	100 %	60,7 ± 11,2 108,6 ± 8,3	2,5 ± 0,06	2,4	100 %	100 %	45 %
<u>7,0</u>	100 %	68,8 ± 16,2 147,8 ± 16,6	2	3,6	100 %	100 %	55 %
<u>9,0</u>	100 %	27,9 ± 12,5 123,2 ± 20,7	2	2,2	100 %	100 %	80 %

dieser Dosierung trat eine starke Senkung der Körpertemperatur um $5,8^{\circ}$ auf.

Abbildung 1 läßt erkennen, daß die Dosiswirkungskurve für Andromedol von der für Andromedotoxin abweicht. Die Effektivkurve ist um ein kleines Stück nach links verschoben, die DE_{20} beträgt für Andromedol $0,32 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$, die DE_{50} $0,35 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ Die Letalitätskurve für Andromedol ist gegenüber der für Andromedotoxin nach rechts verschoben, die DL_{50} beträgt $6,5 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$

Tabelle 4 gibt ähnliche Verhältnisse wieder, wie sie bereits für Andromedotoxin beschrieben worden sind. Die Latenzzeit nimmt auch hier mit höherer Dosierung ab. Aber auch die Zahl der RZ, die pro Minute innerhalb einer Versuchsreihe gemacht werden, nimmt bei hohen Dosen ab. Auch die Kurve, die die Zahl der RZ pro Maus in Abbildung 2 darstellt, sinkt, nachdem sie bei $7 \mu\text{g}/20 \text{ gr.}$ mit 149 RZ das Maximum erreicht hat, wieder ab.

Der Verlauf der Körpertemperatur entspricht zwar weitgehend dem des Andromedotoxins, doch zeigte sich bei den kleineren Dosen eine etwas stärkere Tendenz zur Steigerung und eine geringere zur Senkung der Körpertemperatur als bei Andromedotoxin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Wirkung des Andromedols, soweit ich sie untersucht habe, qualitativ mit der des Andromedotoxins übereinstimmt. Ein entscheidender Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen liegt in der Stärke der Wirkungen in dem Sinne, daß das Andromedol gegenüber dem Andromedotoxin eine größere Wirkbreite, d.h. eine etwas stärkere periphere Wirkung (RZ) und eine geringere Toxizität besitzt (DL).

TABELLE 5

Auswertung der Körpertemperaturmessung

Versuche mit Andromedol

Dosis/20 gr. Kö.-gew. µg	Temperaturerhöhung zeigten:	keine Temperatur- veränderung	Temperatursenkung zeigten:
<u>0,35</u>	50 % um: $0,6 \pm 0,08$	-	50 % um: $0,4 \pm 0,07$
<u>0,4</u>	40 % um: $0,9 \pm 0,07$	-	60 % um: $0,9 \pm 0,08$
<u>0,5</u>	35 % um: $0,7 \pm 0,12$	10 %	55 % um: $0,4 \pm 0,03$
<u>1,0</u>	25 % um: $0,7 \pm 0,05$	5 %	70 % um: $0,8 \pm 0,05$
<u>2,0</u>	10 % um: 0,7	-	90 % um: $1,8 \pm 0,07$
<u>3,0</u>	-	-	100 % um: $2,5 \pm 0,2$
<u>4,0</u>	-	-	100 % um: $4,0 \pm 0,2$
<u>5,0</u>	-	-	100 % um: $3,7 \pm 0,4$
<u>6,0</u>	-	-	100 % um: $3,6 \pm 0,06$
<u>7,0</u>	-	-	100 % um: $3,2 \pm 0,4$
<u>9,0</u>	-	-	100 % um: $5,8 \pm 0,8$

3. Bestimmung der Wirkung des Monoacetyl-derivates von Andromedol

Es wurden sechs Versuchstiere in steigender Dosierung von 5 μg bis 50 $\mu\text{g}/20$ gr. mit dem aus der Acetylierung von Andromedol gewonnenen Monoacetylderivat behandelt. Es trat bei keinem der Tiere eine RZ-Wirkung auf. Änderungen der Körpertemperatur wurden beobachtet, die jedoch nicht größer waren als bei unbehandelten Mäusen.

4. Bestimmung der Wirkung von Diacetylandromedol

Es wurden sechs Versuchstiere in steigender Dosierung von 5 μg bis 50 $\mu\text{g}/20$ gr. behandelt. Es trat auch hier keine RZ-Wirkung auf, doch zeigte eine Maus bei der 10fachen Dosis (= 50 μg) einige wenige RZ. Man kann vermuten, daß die Verbindung noch Spuren von Andromedol als Verunreinigung enthielt, und die schwache Wirkung hierdurch zu erklären ist.

5. Bestimmung der Wirkung des Monoanhydro- und des Dianhydroderivates des Andromedols

Substanz E: Monoanhydroandromedol.

Dosen von 3 - 10 $\mu\text{g}/20$ gr. waren wirkungslos.

Substanz F: Dianhydroandromedol.

Fünf Versuchstiere erhielten 10 und 20 $\mu\text{g}/20$ gr. Auch hier trat keine Wirkung ein.

III. DISKUSSION

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden die einzelnen Derivate des Andromedotoxins hinsichtlich der Relation der biologischen Wirkung zur chemischen Struktur betrachtet.

Die Hydrolyse des Andromedotoxins ergab das Andromedol, das sich im Tierversuch wirksam zeigte.

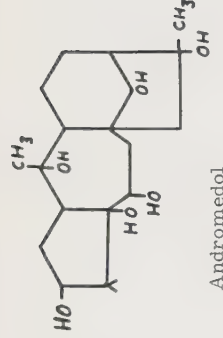
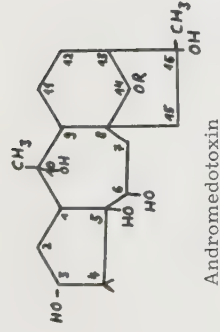
Siehe Formel I.

Der Acetylrest befand sich an der OH-Gruppe an C14. Nach dessen hydrolytischer Abspaltung war im Tierversuch die Wirkbreite gegenüber dem Andromedotoxin vergrößert, d. h. die DE_{20} um ein wenig verkleinert und die DL_{50} deutlich vergrößert, wie aus den Abbildungen 1 und 2 ersichtlich.

Daraus folgt, daß die OH-Gruppe an C14 ohne wesentlichen Einfluß auf die pharmakologische Wirkung dieser Substanz ist. Wird diese Hydroxylgruppe mit einem Acetylrest besetzt, so wird die Wirkung zwar qualitativ etwas verändert, aber nicht aufgehoben.

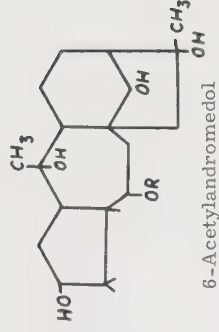
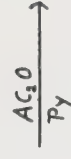
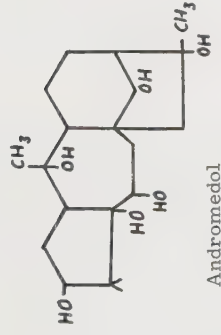
Die Acetylierung des Andromedols, d. h. der entacetylierten Verbindung des Andromedotoxins, führte nicht wieder zu dem ursprünglichen Andromedotoxin, sondern zu einem pharmakologisch unwirksamen Monoacetylderivat des Andromedols. Demnach hatte sich die Acetylgruppe nicht, wie es dem natürlich vorkommenden Andromedotoxin entspricht, mit der OH-Gruppe an C14 verestert. Die Acetylierung war an einer anderen Stelle eingetreten, und zwar an der an C6 befindlichen freien sekundären OH-Gruppe, wie es durch die auf

Formel I

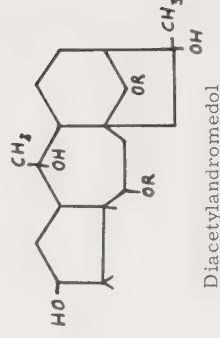
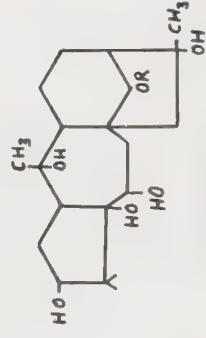


R = Acetyl

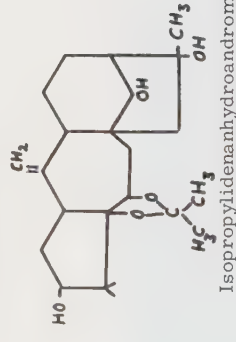
Formel II



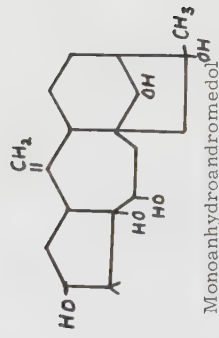
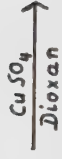
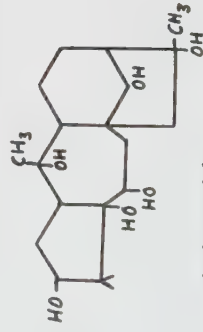
Formel III



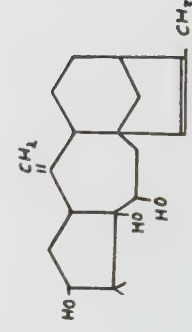
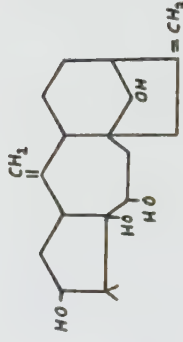
Formel IV



Formel V



Formel VI



Seite 15 beschriebenen Versuche bewiesen ist.

Siehe Formel II.

Aus dem Gesagten folgt weiter, daß die an C6 sich befindende freie sekundäre OH-Gruppe für die biologische Wirkung erforderlich ist. Durch ihre Blockierung wird die pharmakologische Wirkung aufgehoben.

Durch Acetylierung des Andromedotoxins, also dem 14-Acetylandromedol, entsteht das im Mäusetest ebenfalls unwirksame Diacetyl-andromedol. Der Verlust der Wirkung läßt sich auch hier dadurch erklären, daß die zweite, synthetisch herangebrachte Acetylgruppe sich mit der freien sekundären OH-Gruppe an C6 verestert und diese blockiert. Wie oben bereits angeführt, ist diese für die biologische Wirkung erforderlich.

Siehe Formel III.

Die Dehydratisierung des Andromedols zum Monoanhydro- und Dianhydroderivat wurde mit entwässertem Kupfersulfat in wasserfreiem Dioxan ausgeführt. Bei Verwendung von Aceton anstelle des indifferenten, an der Umsetzung sich nicht beteiligenden Dioxans wurde vermutlich die Isopropylidenanhydroverbindung erhalten, wie sie in der Literatur beschrieben wird (2). Das von Iwasa (2) hergestellte Isopropylidenanhydroandromedol hat einen Schmelzpunkt von 108 - 109°C, der Schmelzpunkt meiner nicht gereinigten Verbindung lag bei etwa 90°C.

Auch diese Verbindung war pharmakologisch unwirksam. Der Grund liegt darin, daß die an C10 sich befindende OH-Gruppe durch die Anhydridbildung verändert ist. Außerdem sind durch Bildung der Isopropylidenverbindung an C5 und C6 auch diese OH-Gruppen blockiert, von denen, wie schon oben gezeigt wurde, die OH-Gruppe an C6 für eine pharmakologische Wirkung erforderlich ist.

Siehe Formel IV.

Bei der Monoanhydroverbindung des Andromedols, die auch in der Natur als Grayanatoxin II vorkommt (2), trat die Dehydratisierung an der tertiären OH-Gruppe in 10-Stellung ein. Diese wird unter den gegebenen Bedingungen als erste angegriffen (2). Durch Absorption von UV-Licht und durch Anlagerung von Osmiumtetroxyd an die Doppelbindung ließ sich das Vorhandensein einer Doppelbindung nachweisen.

Siehe Formel V.

Im Tierversuch zeigte diese Verbindung bei einer Dosis bis zu 10 µg/20 gr. Maus keine pharmakologische Wirkung, die Mäuse machten kein RZ und die Körpertemperatur änderte sich nicht signifikant. Diese Beobachtung erlaubt die Folgerung, daß neben der sekundären OH-Gruppe an C6 auch diese tertiäre OH-Gruppe an C10 für die spezifische pharmakologische Wirkung dieses Moleküls erforderlich ist. Wird also die Struktur an C10 des natürlich vorkommenden Andromedols chemisch verändert, wird die biologische Wirkung aufgehoben. Die Frage, ob das Molekül in einer Dosis noch höherer Größenordnung eine Wirkung haben könnte, wurde von mir nicht weiter verfolgt.

Die Darstellung der Dianhydroverbindung des Andromedols machte große Schwierigkeiten. Die Dehydratisierung trat bei diesem Derivat zunächst an der tertiären OH-Gruppe an C10 ein, es bildete sich zuerst das Monoanhydroandromedol. Die weitere Dehydratisierung des Moleküls zum Dianhydroandromedol erfolgte an der tertiären OH-Gruppe an C16. Wie nun Tallent (4) beschrieben hat, ist es nicht wahrscheinlich, daß dabei eine einheitliche Verbindung erhalten werden kann. Tallent (4) erhielt bei seinen Versuchen zwei Isomere im Verhältnis 4:1. Die Isomerie bezieht sich auf die Lage der Doppelbindungen, von denen das Isomere mit der Doppelbindung außerhalb des Ringes das vorherrschende war. Aufgrund von Modellbetrachtungen kann man sich vorstellen, daß die Exoverbindung

vorherrscht, da in diesem Falle nur eine Winkelverzerrung in C16 eintreten muß. Bei einer Endodoppelbindung müßte zusätzlich an C15 eine Winkelverzerrung eintreten, was bei dem starren bicyclischen Ringsystem an dieser Stelle wegen der auftretenden Ringspannung weniger wahrscheinlich ist.

Siehe Formel VI.

Diese Verbindung war, wie erwartet, in der von mir verabreichten Dosierung wirkungslos. Auch hier bleibt dahingestellt, ob etwa die Dianhydroverbindung in einer Dosis nach höherer Größenordnung wirksam sein könnte.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Andromedotoxin und die in chemischen Versuchen hergestellten Derivate wurden biologisch untersucht. Es ergab sich, daß die pharmakologische Wirkung dieser Substanzen abhängig ist von einer ganz bestimmten chemischen Struktur des Moleküls. Werden bestimmte OH-Gruppen durch chemische Eingriffe verändert, geht die pharmakologische Wirkung verloren.

Es bleibt dahingestellt, ob noch weitere OH-Gruppen des Moleküls für die biologische Wirkung von Bedeutung sind. Die Klärung dieser Frage bleibt weiteren Versuchen überlassen.

Herrn Professor Dr. med. P. Pulewka danke ich herzlich für die Anregung zu dem interessanten Thema und den stets gewährten Rat bei der Ausführung der Arbeit.

Herrn Dipl.-Chemiker Dr. rer. nat. H. Eberhardt bin ich für die Anleitung bei der Ausführung der chemischen Versuche sehr zu Dank verpflichtet.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Wood H.B. , Stromberg V. L. , Keresztesy J. C. and Horning E. C.
Andromedotoxin. A Potent Hypotensive
Agent from *Rhododendron maximum*.
Am. Soc. 76, 5689 (1954).
- 2.) Iwasa J. , Kumazawa I. , Nakajima M.
Structure of Grayanotoxins.
Chemistry and Industry (London), 511
(1961) and Agr. Biol. Chem. (Japan)
25, 782 (1961).
- 3.) Kakisawa H. , Yanai M. , Kozima J. Nakanishi K.
The Stereochemistry of the Grayanotoxins.
Tetrahedron Letters, 6, 215-219 (1962).
- 4.) Tallent W. The Stereochemistry of Acetyl-andromedol.
J. org. Chem., 27, 2668 (1962).
- 5.) Trunzler G. Ein weiterer Beitrag zur Pharmakologie und
Toxikologie des Andromedotoxins, einer blut-
drucksenkenden Substanz im pflanzlichen Anti-
hypertonicum Rauwoplant®.
Mitt. aus Forschung und Praxis 2 (1958)
- 6.) Pulewka P. Über andromedotoxinhaltigen Honig und eine
biologische Methode zur Bestimmung seiner
Giftigkeit.
Bull. Fac. Med. Istanbul, 12 (1949).

- 7.) Hardikar S. W. On Rhododendron Poisoning.
J. of Pharm. and exp. Therap. 20, 17 (1923)
- 8.) Moran N. C., Dresel P. E., Perkins M. E., Richardson A. P.
The Pharmacological Actions of Andromedotoxin,
an Active Principle from Rhododendron maximum.
J. of Pharm. and exp. Therap., 111, 415 (1954).
- 9.) Duquesnel und Laborde. Des Aconites et de l' Aconitine.
(Paris, 1883.)
- 10.) Pulewka P. und Grevenner H. Versuche über die resorptive
Wirkung von Aconitinsalben nebst einer neuen Me-
thode zum Nachweis und zur Bestimmung des
Aconitins auf biologischem Wege.
Arch. f. exp. Pathol. und Pharm., 177, 74 - 84
(1934).
- 11.) Pulewka P., Bühler M., Klumpp B. Sekundenverschluss der
Bronchien durch Reizgifte.
Arzneimittelforschung, 10, 953 - 955 (1960).
- 12.) Vahrson H. Inaugural-Dissertation, Tübingen 1964.
- 13.) Neuhoff E. Zur Gehaltsbestimmung von Andromedotoxin.
Aus d. Entwicklungslaboratorien d. Fa. Dr.
Wilmar Schwabe, Karlsruhe.
"Aus unserer Arbeit", 10 (1958).
- 14.) Stahl E. Dünnschicht-Chromatographie. S. 139.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
1962.
- 15.) Fieser L. F. und Fieser M. Organische Chemie, S. 339.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Bergstr.
1965.

Lebenslauf

Am 30. November 1935 wurde ich, Ingeborg Hartenstein, in Berlin als Tochter des Landwirtschaftsdirektors Eugen Hartenstein und seiner Ehefrau Elfriede geb. Frühstück geboren.

Von 1942 bis 1946 besuchte ich in Bayreuth die Grundschule und ab Herbst 1946 das Realgymnasium für Mädchen in Bayreuth, an dem ich 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1955 bis 1957 war ich Apothekerpraktikantin in der Hof-Apotheke in Bayreuth. Dieser praktischen Ausbildung folgte ab dem Wintersemester 1957/58 an der Universität Tübingen das Studium der Pharmazie, das ich 1960 in Tübingen mit dem pharmazeutischen Staatsexamen abschloß. An der gleichen Universität begann ich im Sommersemester 1961 mit dem Studium der Medizin. Im Wintersemester 1966/67 legte ich in Tübingen das medizinische Staatsexamen ab.

Vom 1. 2. 1967 bis 31. 5. 1967 war ich am Toxikologischen Institut der Universität Tübingen als Medizinalassistentin beschäftigt.

